



PERBANDINGAN MORFOLOGI DAN KEPELBAGAIAN GENETIK  
VARIAN-VARIAN PADI (*ORYZA SATIVA* COMPLEX) DI  
JELAPANG PADI PULAU PINANG

OLEH

ZAINUDIN BIN PMD HUSSAIN

PUSAT PENGAJIAN SAINS KAJIHAYAT  
UNIVERSITI SAINS MALAYSIA  
PULAU PINANG

MEI 2010

PERBANDINGAN MORFOLOGI DAN KEPELBAGAIAN  
GENETIK VARIAN–VARIAN PADI (*ORYZA SATIVA*  
COMPLEX) DI JELAPANG PADI PULAU PINANG

OLEH

ZAINUDIN BIN PMD HUSSAIN

Satu disertasi diserahkan untuk memenuhi sebahagian daripada syarat  
penganugerahan Ijazah Sarjana Sains

Ijazah Sarjana Sains (Bioteknologi)

PUSAT PENGAJIAN SAINS KAJIHAYAT  
UNIVERSITI SAINS MALAYSIA  
PULAU PINANG

MEI 2010

## **PENGHARGAAN**

Setinggi-tinggi penghargaan dan ucapan berbanyak terima kasih kepada penyelia saya, Prof. Madya Dr. Ahmad Sofiman Othman atas khidmat nasihat dan panduan yang diberikan disamping kemudahan makmal, bahan dan peralatan serta peruntukan sepanjang kajian dijalankan.

Penghargaan dan ucapan terima kasih juga pada Staf MARDI Dr. Azmi Man, Cik Asfaliza Ramli, En. Chew, En. Shaharudin dan Pn. Rasidah atas bekalan biji benih asas padi dan pandangan, sokongan moral sepanjang projek tersebut.

Penghargaan dan ucapan terima kasih pada Hj. Faridah, Pn. Roziana, Pn. Zue, Cik Lin dan rakan-rakan makmal bilik 409 (Dr. Sofiman) serta semua staf Pusat Sains Kajiayatan yang memberi tunjuk ajar dan kerjasama bagi menjayakan projek saya.

Setinggi penghargaan dan ucapan terima kasih kepada Pengurusan USM memberikan kemudahan dan peluang pengajian.

Setinggi penghargaan dan berbanyak terima kasih kepada pengurusan MARDI atas tawaran biasiswa dan pembiayaan sepanjang mengikuti pengajiaan ini.

Akhir sekali ucapan terima kasih pada isteri dan anak-anak yang memberi sokongan moral dan dorongan sepanjang kursus di USM.

## **TERIMA KASIH**

## **Isi Kandungan**

## **Muka surat**

<b>Penghargaan</b>	ii
<b>Isi Kandungan</b>	iii
<b>Senarai Jadual</b>	vi
<b>Senarai Gambarajah</b>	vii
<b>Senarai Graf</b>	vii
<b>Senarai Gambar Foto</b>	viii
<b>Senarai Histogram</b>	ix
<b>Lampiran</b>	ix
<b>Senarai singkatan kata</b>	x
<b>Abstrak</b>	xi
<b>Abstract</b>	xiii

<b>Bab</b>	<b>Tajuk</b>	
<b>1.0 Pengenalan</b>		1
<b>2.0 Tinjauan bahan bacaan</b>		3
2.1	<i>Oryza sativa</i>	3
2.2	Varian padi angin	8
2.3	Jelapang Padi Pulau Pinang	9
2.4	Varieti komersial	12

2.5 DNA mikrosatelit	14
2.6 Tindak balas rantaian polymerase, PCR	16
2.6.1 Pengenalan	16
2.6.2 Teknik PCR	17
2.7 Elektroforesis gel	21
2.8 Aplikasi mikrosatelit sebagai penanda DNA	21
<b>3.0 Bahan dan kaedah</b>	24
3.1 Pengumpulan sampel	24
3.2 Pencirian morfologi di sawah	26
3.3 Pengujian percambahan biji benih	26
3.4 Penanaman benih dalam rumah tanaman	28
3.5 Pencerapan data morfologi benih dalam rumah tanaman	29
3.6 Pengekstrakan DNA dari sampel daun	32
3.6.1 Kaedah pengekstrakan DNA varian padi	32
3.6.2 Elektroforesis bahan DNA	34
3.6.3 Tindakbalas PCR- DNA mikrosatelit	35
3.6.4 Gel Poliakrilamida 6%	39
3.7 Analisa data	40
<b>4.0 Keputusan</b>	44
4.1 Jumlah varian yang dikenalpasti	44
4.2 Taburan varian padi mengikut perbezaan matrik morfologi	45
4.3 Keputusan percambahan biji benih	49
4.4 Data morfologi tumbuhan	51

4.4.1 Perbandingan rupa bentuk pokok	51
4.4.2 Perbandingan ciri daun	52
4.4.3 Pencirian tangkai padi	55
4.4.4 Pencirian biji padi	60
4.5 Pengekstrakan DNA setiap varian	63
4.6 Produk-PCR amplikasi mikrosatelit	63
4.7 Ujian keseimbangan Hardy-Weinberg HWE	65
4.8 Analisa “Principal Component Analyses” PCA	70
4.9 Agihan individu dalam kluster	70
<b>5.0 Perbincangan</b>	77
5.1 Varian padi mengikut perbezaan morfologi dan Percambahan biji benih	77
5.2 Morfologi rupa bentuk pokok	78
5.3 Pencirian komponen hasil	80
5.4 Perbandingan genotip varian padi	81
5.5 Pengkelasan individu dan populasi varian padi	85
<b>6.0 Rumusan</b>	89
<b>7.0 Rujukan</b>	92
<b>8.0 Lampiran</b>	99
8.1 Senarai apendiks	99
8.2 Seminar dan penerbitan	118

## **Senarai Jadual**

Jadual 2.1 -	Taburan penggunaan varieti di jelapang padi Negeri Pulau Pinang	11
Jadual 3.1 -	Lokasi kawasan kajian di Pulau Pinang	24
Jadual 3.2 -	Ciri-ciri yang digunakan untuk perbandingan varian padi berdasarkan SES	27
Jadual 3.3 -	Ciri morfologi untuk perbandingan sifat dalam kalangan varian padi kajian	30
Jadual 3.4 -	Tarikh merekod data sifat morfologi varian padi yang dikaji	31
Jadual 3.5 -	Senarai pencetus SSR yang diguna bagi saringan templat DNA varian padi	37
Jadual 3.6 -	Kepekatan $MgCl_2$ dan suhu penyepuhan berbeza	38
Jadual 4.1 -	Ciri morfologi peringkat pertumbuhan pokok padi	53
Jadual 4.2 -	Ciri morfologi daun varian padi dan varieti komersial	54
Jadual 4.3 -	Ciri morfologi peringkat analisa komponen hasil varian padi	59
Jadual 4.4 -	Nilai kebarangkalian P untuk setiap pencetus dan populasi	67
Jadual 4.5 -	Nilai pekali $F_{IS}$ yang mengukur pada semua populasi	68
Jadual 4.6 -	Pengagihan semua individu dalam populasi (Q) yang terbahagi pada 18 kluster	74

## Senarai Gambarajah

Gambarajah 2.1 -	Proses kacukan antara baka <i>Oryza</i> yang menghasilkan varian padi angin	5
Gambarajah 2.2 -	Peta lokasi jelapang padi di negeri Pulau Pinang	10
Gambarajah 2.3 -	Langkah-langkah proses amplifikasi yang berlaku dalam setiap kitar PCR	19
Gambarajah 3.1 -	Peta lokasi persampelan varian padi di negeri Pulau Pinang	25
Gambarajah 4.1 –	Taburan kedudukan varian mengikut lokasi berdasar PCA pada paksi 1 dan paksi 2	46
Gambarajah 4.2 –	Taburan kedudukan varian mengikut jenis dan rupa bentuk tangkai berdasar PCA pada paksi 1 dan paksi 2	48

## Senarai Graf

Graf 4.1 –	Graf peratus percambahan biji benih dan tempoh masa mengikut varian	50
Graf 4.2 –	Graf bilangan alel dan saiz jalur (bp) terhasil dengan 8 pencetus	68
Graf 4.3 –	Graf taburan kedudukan genotip pada semua varian padi berdasar Scatter plot PCAGEN	71
Graf 4.4 –	Graf nilai min $L(K)(\pm SD)$ bagi nilai K untuk 25 pusingan keatas semua populasi dikaji	72
Graf 4.5 –	Graf nilai $\Delta K$ melalui pengiraan $\Delta K = m1 L''(K)/S[L(K)]$ . Nilai kemuncak $K = 18$ ditunjukkan dalam bentuk bulatan dalam graf.	72



## Senarai Gambar Foto

Gambar foto 2.1 -	Gambar kehadiran varian padi angin dalam petak sawah	10
Gambar foto 2.2 -	Gambar pokok padi ( <i>Oryza sativa</i> ) varieti MR 84	13
Gambar foto 2.3 -	Gambar pokok padi ( <i>Oryza sativa</i> ) varieti MR 185	13
Gambar foto 2.4 -	Gambar pokok padi ( <i>Oryza sativa</i> ) varieti MR 211	15
Gambar foto 2.5 -	Gambar pokok padi ( <i>Oryza sativa</i> ) varieti MR 219	15
Gambar foto 4.1 a -	Varian padi rupa bentuk tangkai terbuka dan bijinya tanpa pigman	56
Gambar foto 4.1 b -	Varian padi rupa bentuk tangkai terbuka dan bijinya berpigman	56
Gambar foto 4.1 c -	Varian padi rupa bentuk tangkai kuncup dan bijinya berpigman	56
Gambar foto 4.1 d -	Varian padi rupa bentuk tangkai kuncup dan bijinya tanpa pigman	57
Gambar foto 4.1 e -	Varian padi tangkai bijinya bersesungut	57
Gambar foto 4.2 a -	Rupabentuk biji padi yang saiznya pendek dan panjang serta berpigman dan tanpa pigman	62
Gambar foto 4.2 b -	Rupabentuk tangkai varian padi berbanding varieti komersial	62
Gambar foto 4.3 a -	Merupakan DNA yang berjaya diekstrak daripada varieti komersial	64
Gambar foto 4.3 b -	Merupakan DNA yang berjaya diekstrak daripada varian padi	64
Gambar foto 4.4 a -	Jalur DNA terhasil dengan menggunakan pencetus RM334	66

Gambar foto 4.4 b - Jalur DNA terhasil dengan menggunakan pencetus RM219	66
<b>Senarai Histogram</b>	
Histogram 4.1 - Ahli populasi dalam kluster bagi varian padi dan varieti komersial	76
<b>Lampiran</b>	99
Apendiks 4.1 - Bilangan cabang tangkai padi dan peratus penguguran biji dari tangkai	100
Apendiks 4.2 - Data ujian kualiti DNA varian padi menggunakan spectrophotometer	101
Apendiks 4.3 - Jadual bilangan dan frenkuensi alel yang terhasil dari amplikasi dengan semua pencetus dan populasi	102
Apendiks 4.4 - Jadual nilai P, heterogosity yang dicerap dan heterogosity yang dijangka	110
Apendiks 4.5 - Jadual nilai min $L(K)(\pm SD)$ , nilai $\Delta K$ melalui pengiraan $\Delta K = m [L''(K)/S[L(K)]]$	113
Apendiks 4.6 - Jadual ANOVA perbandingan ciri morfologi varian padi dan varieti komersial pada nilai $p = 0.05$ ujian LSD	116
Seminar dan Penerbitan	118
Zainudin, H., Ahmad Sofiman, O., & Azmi, M. Morphological Characteristics of Selected Weedy Rice Variants ( <i>Oryza Sativa</i> Complex) In Penang's Rice Granary Area. (The Sixth Regional IMT-GT UNINET Conference 2008, The Gurney Resort Hotel & Residences, Penang, Malaysia, 28-30 August 2008). PERSEMBAHAN LISAN.	

### Senarai Singkatan Kata

°C	Celcius
bp	Base pair (s)
CaCl <sub>2</sub>	Kalsium Klorida
DNA	Deoxyribose nucleic acid
dNTP	Deoxyribonucleotide triphosphates
EDTA	Ethylene diaminetetraacetic acid
HLS	Hari lepas Semai
HLT	Hari lepas tanam
Kbp	Kilobase pair (s)
MgCl <sub>2</sub>	Magnesium Klorida
NaCl	Natrium Klorida
OD	Ketumpatan optikal
P	Kebarangkalian
PCR	Tindak Balas Rantaian Polimerase
rpm	Revolution per minutes
S.E.	Standard error
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate
SSR	Ulangan Jujukan Ringkas
STS	Jujukan Urutan Pendek
T <sub>m</sub>	Suhu lebur
TBE	Tris-borate-EDTA
TE	Tris-EDTA
TEMED	N, N, N',N' - tetramethylethylenediame
UV	Ultra ungu
V	Volt
v/v	isipada/isipadu
w/v	jisim/isipadu

# **PERBANDINGAN MORFOLOGI DAN KEPELBAGAIAN GENETIK VARIAN-VARIAN PADI (*ORYZA SATIVA* COMPLEX) DI JELAPANG PADI PULAU PINANG**

## **ABSTRAK**

Kepelbagaian varian padi angin boleh ditemui dalam petak sawah yang mengamalkan kaedah tabur terus. Kebanyakan varian padi angin seiras dengan varieti komersial menyebabkan ianya sukar dikawal. Satu persampelan telah dijalankan di empat lokasi jelapang padi Pulau Pinang untuk kajian perbandingan morfologi dan genotip varian padi angin. Kajian ini bertujuan membuat perbandingan 17 ciri morpho metrik yang dikenalpasti serta perbandingan DNA antara varian dan varieti komersial. Sebanyak 36 varian padi angin berbeza telah dikenalpasti dari empat lokasi tersebut berasaskan sifat tinggi pokok, tinggi batang, panjang daun, rupabentuk dan panjang tangkai, berat 1000 biji dan tempoh matang. Perbandingan juga dijalankan dengan 4 varieti komersial yang ditanam dari lokasi kajian bersama 4 varieti benih asas MARDI dan satu varieti padi liar (*O. rufipogon*). Analisa morpho metrik PCA menunjukkan bahawa 45.88 % taburan variasi varian padi angin dan varieti komersial terkandung dalam 3 paksi. Paksi pertama mengandungi 20.63 % taburan variasi yang dikenal pasti melalui ciri berat 1000 biji, bilangan biji bernas, bilangan hampa, lebar daun, rupabentuk pokok dan ciri kekesatan permukaan daun. Pada paksi kedua mengandungi sebanyak 13.78 % perbezaan metrik dan paksi ketiga menunjukkan sebanyak 10.16 % perbezaan metrik. Analisa STRUCTURE menggunakan data DNA mikrosatelit berjaya mengumpulkan kebarangkalian ahli populasi (K) dari 45 varian dalam 18 kluster. Berdasarkan nilai  $F_{ST}$ , varieti komersial MR 219 berkelompok dalam satu kumpulan

bersama dengan sebahagian individu dari varian padi angin PP 1. Kluster 8 dianggotai secara eksklusif oleh individu SGN 4, seterusnya padi liar dan varian padi yang mempunyai biji sesungut berkumpul dalam kluster 11. Varian padi angin PB 6, PP 2 dan SGA 5 mempunyai bilangan anak yang banyak, tangkai buah yang terpanjang, batang pokok yang tinggi dan daun terpanjang berbanding varieti komersial. Panjang biji padi dan kandungan klorofil pada 60-70 DAS pada varieti komersial adalah lebih tinggi berbanding varian padi lain. Perbandingan dan pengasingan semua individu dan populasi telah berjaya dilakukan menggunakan sifat morfologi dan ciri genotip.

# **COMPARISON OF MORPHOLOGICAL CHARACTERISTICS AND GENETIC DIVERSITY OF RICE VARIANTS (*ORYZA SATIVA*) FROM PENANG'S RICE GRANARY AREA**

## **ABSTRACT**

Many rice variants can be found in many direct-seeded rice fields. These weedy rice variants possess similar morphological characteristics to cultivated rice varieties, making them more difficult to control as compared to other weeds. A comparative morphological study was conducted by collecting weedy rice variants from the four sites within the Penang rice growing areas. The objective of this study was to compare the 17 identified morphometric characteristics and DNA of commercial varieties. 36 different variants were identified based on plant height, flag leaf length and maturation days. Observation were also included 4 commercial variety sampled from the location, 4 set purified seed commercial varieties from MARDI and one wild rice varieties (*O. rufipogon*). The PCA analyses of morphometric showed that 45.88 % variation of weedy rice variants and commercial varieties were observed within the three axis. The first axis accounted for 20.63 % of the variation and was characterised by 1000 grain weight, number of filled grain, number of empty grain, leaf width, plant erectness and leaf pubescence. Second and third axis showed 13.78 % and 10.16 % matrixes' differences respectively. STRUCTURE analysis suggested that the most likely number of cluster (*K*) for 45 the variants in this study was equal to eighteen. Based on pairwise  $F_{ST}$  values, Commercial varieties MR 219 were group together with some proportion of individual from PP 1 weedy rice variants. Cluster 8 was exclusively consisted of SGN 4 individuals (weedy rice variants), meanwhile wild rice and variants with awn seed were grouped

together in cluster 11. Weedy rice variants such as PB 6, PP 2 and SGA 5 had the highest number of tillers, longer panicle length, culms height and leaf length compared to commercial rice. However, grain size of commercial varieties was slightly longer and the chlorophylls content at 60-70 DAS was higher than other rice variants. Morphological characters and genomic analyses were able to distinguish all the 45 variants used in the study.

## 1.0 Pengenalan

Pada masa kini terdapat sekitar 249,646 hektar kawasan sawah padi dalam negara Malaysia. Ianya meliputi kawasan sawah di lapan jelapang padi utama yang mempunyai skim pengairan utama, kawasan bukan dalam skim pengairan serta kawasan penanaman padi yang bergantung pada hujan. Di Pulau Pinang terdapat 12,701 hektar kawasan sawah dan sebanyak 10,263 hektar merupakan satu dari kawasan jelapang padi dalam negara yang mengeluarkan purata hasil sekitar 4,317 kg/ha. Kerajaan Malaysia telah menetapkan tahap saraan diri ke peringkat 95 % pengeluaran beras negara menjelang tahun 2010 yang meliputi semua kawasan jelapang termasuk pengeluaran padi di Pulau Pinang. Pelbagai insentif telah disediakan seperti projek padi pengeluaran hasil 10 tan/ha, pemberian input dan pemberian insentif wang tunai kepada petani yang dapat mengeluarkan hasil padi melebihi 10 tan/ha untuk tujuan peningkatan purata hasil negara demi mencapai tahap sara diri yang disasarkan (Jabatan Pertanian, 2007) . Walaubagaimanapun, masih terdapat beberapa masalah yang timbul di peringkat pengurusan sawah mengakibatkan pengeluaran hasil masih rendah, satu daripadanya adalah masalah padi angin terutama pada petani yang mengamalkan kaedah penanaman padi tabur terus (Azmi *et al.*, 2008).

Pada awal tahun 1980an, sektor pertanian bersaing dengan industri ekonomi yang lain mengakibatkan persaingan dalam mendapat tenaga kerja memandangkan golongan muda cenderung ke sektor lain yang menjamin persekitaran kerja yang menarik dan pendapatan yang terjamin. Keadaan ini telah menyebabkan kekurangan tenaga kerja dan kos upah meningkat dalam sektor pertanian dan ianya telah menjurus kepada perubahan amalan kultura dari kaedah mencedung ke amalan tabur terus



penanaman padi. Amalan budaya kaedah tabur terus yang digunakan berterusan sehingga kini telah menyebabkan kehadiran kepelbagaian varian padi termasuk varian padi angin dalam petak sawah. Permodenan dalam sistem penuaian yang menggunakan jentera penuai padi mengakibatkan kerugian hasil sekitar 10% (Jabatan Pertanian Malaysia, 2004) juga menyumbangkan kepada pertumpahan biji padi ke dalam petak sawah dan pertambahan biji benih dalam bank tanah. Di samping itu penggunaan biji benih padi yang tidak tulen dan amalan pengurusan budaya yang tidak betul merupakan faktor tambahan kemunculan varian-varian padi terutama padi angin. Kepelbagaian fenotip dan genotip varian padi sukar dikawal sepenuhnya disebabkan morfologi yang seiras dengan varieti komersial yang diusahakan. Lebih merumitkan lagi masalah ini ketiadaan racun rumpai yang selektif bagi pengawalan varian padi yang tidak dikehendaki dalam petak sawah. Dari tinjauan dan rujukan yang dijalankan, di dapati belum ada kajian yang spesifik dilakukan bagi perbandingan genetik dan fenotip kehadiran pelbagai varian di jelapang padi Pulau Pinang. Ini telah mendorong satu kajian dilakukan untuk mendapatkan varian-varian padi yang berbeza dari beberapa lokasi petak sawah di Pulau Pinang. Kajian ini meliputi perbandingan pada sifat morfologi, fisiologi dan kaedah bioteknologi.

Objektif kajian adalah untuk melihat persamaan ciri-ciri morfologi dan persamaan genetik dalam kalangan varian padi angin dan varieti komersial. Dari kajian ini juga boleh dikenal pasti persamaan dan perbezaan dalam kalangan varian padi angin. Seterusnya ianya dapat melihat persamaan genetik antara varian padi angin dan varieti komersial di seluruh kawasan kajian sawah padi di Pulau Pinang.

## 2.0 Tinjauan Bahan Bacaan

### 2.1 *Oryza sativa*

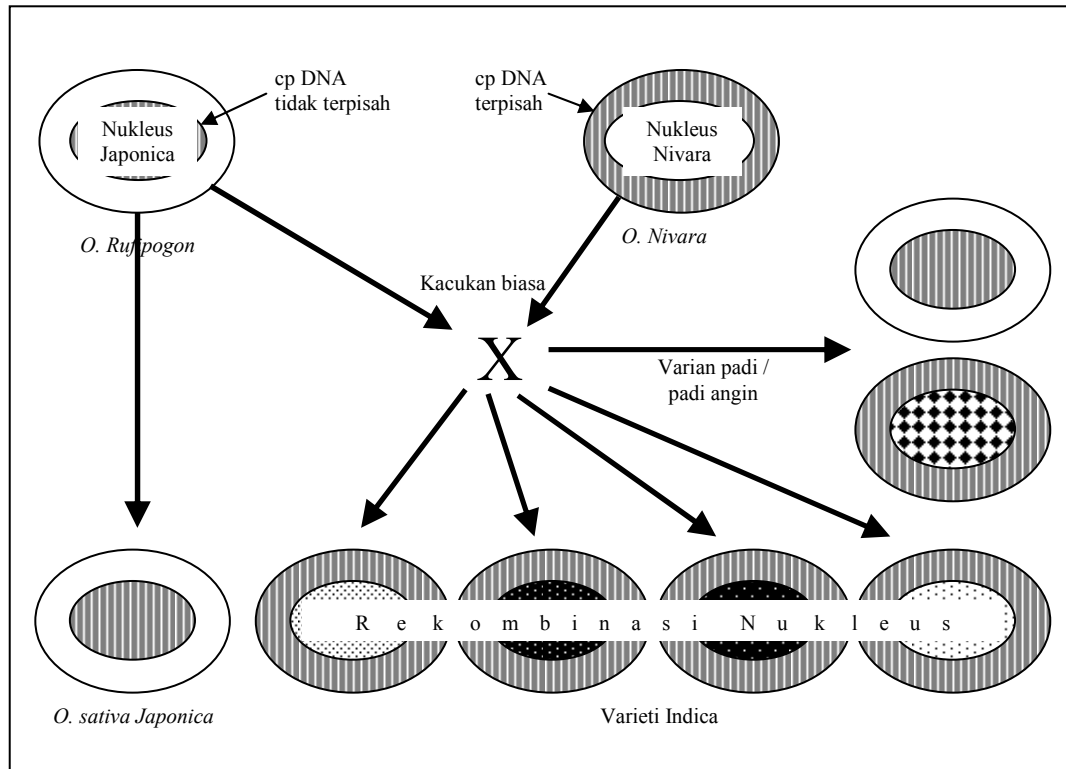
Padi (*Oryza sativa*) yang ditanam di Asia adalah dipercayai berasal dari kaki bukit banjaran atau kawasan Assam-Yunan (Chang, 1976). Hasil kajian menunjukkan perhubungan filogenetik kebanyakan varieti yang diusahakan mempunyai persamaan leluhur dengan varieti semulajadi di kawasan tersebut (Ting 1961; Oka & Chong 1962; Chang 1976). Di Malaysia, penanaman padi telah diperkenalkan oleh penghijrah dari barat laut China dan diperluas dengan kaedah penanaman campuran pelbagai tanaman dan perternakan (Caponera, 1978). Seterusnya pelbagai kaedah penanaman padi seperti di kawasan tinggi, kawasan tadahan hujan dan persisiran pantai telah menghasilkan diversiti genetik padi termasuk baka-baka tradisional. Pembangunan varieti yang dijalankan oleh MARDI sejak 1970an telah menghasilkan pelbagai varieti termasuklah kacukan baka Japonica dan Baka Indica (Othman *et al.*, 1986). Ianya telah menambahkan taburan genetik dan biodiversiti dalam negara ini.

Dari segi morfologi lazimnya, baka Japonica mempunyai sesungut pada bijinya, penghujung spikelet yang berpigmen dan banyak cabang tetapi baka Indica mempunyai sifat yang sebaliknya. Pokok baka Japonica biasanya adalah pokok yang rendah dan bilangan anaknya yang sedikit tetapi baka Indica mempunyai ketinggian yang lebih dan bilangan anak yang banyak. Satu lagi baka padi yang ditemui dalam jelapang dikenali sebagai padi liar, *Oryza rufipogon*. Ianya mempunyai sifat pokok yang menjalar dan terapung di atas air, mempunyai buku ruas yang panjang, penjuluran tangkai sempurna dengan cabang utama tangkai dan ranting yang tidak rapat, biji bersesungut 5 - 40 cm panjang dan mempunyai tip pada seludang daunnya (Abdulah *et al.*, 1994).

Penghasilan biji benih rendah dan kebanyakan dari populasi baka ini mempunyai sensitiviti cahaya yang panjang ( Rao *et al.*, 2007).

Baka padi yang didomestikasikan dari generasi ke generasi akan menyebabkan pengurangan diversiti gen dalam sesuatu populasi. Kajian terdahulu menunjukkan kultivar Indica lebih tinggi diversiti genetik berbanding kultivar Japonica (Tang & Morishima, 1997). Dalam kaedah tabur terus, di samping tumbuhnya varieti padi yang ditabur oleh petani, tumbuh juga varian padi angin yang berbeza dan padi liar. Kehadiran padi angin yang berbeza mungkin disebabkan berlaku penghibridan antara baka varian padi angin sediaada dengan baka induk liar. Ia juga berkemungkinan hasil kacukan baka induk liar dengan baka domestik. Kebelakangan ini pengaliran gen menunjukkan bahawa aliran gen kultivar lebih tinggi berbanding padi liar. Ini disebabkan oleh kurangnya fertiliti biji benih dan kurangnya aliran kacukan luar bagi baka padi liar. Gambarajah 1, menunjukkan proses pengaliran gen akan menyumbangkan kehadiran padi angin yang mempunyai genom nukleus jenis indica dan genom sitoplasma dari jenis japonica (Sato, 2000).

Pemerhatian terhadap 40 lokus isozim polimorfik menunjukkan bahawa baka indica dan japonica mempunyai leluhur yang berbeza (Second, 1982), maka hipotesis pewarisan filogenetik bagi kedua-dua spesis ini diandaikan mempunyai asal usul samada satu atau banyak leluhur. Kajian Chang *et al.*, (1976) menunjukkan bahawa wujudnya ketidak seimbangan komposisi alel pada lokus yang boleh membezakan kumpulan indica dan kumpulan japonica.



Gambarajah 2.1 ; Proses kacukan antara baka baka oryza yang boleh menghasilkan varian padi angin (Sato,2000)

Di samping itu kehadiran padi liar seperti *O. ruffipogon* mempunyai gen yang dapat dibezakan dengan baka kultivar melalui kajian genomik DNA dan isozim yang telah dilaksanakan oleh kumpulan penyelidik Chen dan rakannya pada tahun 1997. Pada masa kini kajian perbandingan genomik DNA juga perlu dijalankan secara serius untuk menentukan salasilah kehadiran varian padi angin.

Di Semenanjung Malaysia padi angin mula dikesan dan dilaporkan di sawah padi di Tanjung Karang sejak tahun 1998 (Wahab & Suhaimi, 1991) dan di kawasan MADA sejak tahun 1990 seterusnya merebak ke kebanyakan lokasi barat semenanjung yang turut mengalami masalah padi angin (Zuki *et al.*,1995).

Pada pertengahan tahun 1980 di Semenanjung Malaysia terdapat satu jangka masa kemarau yang agak panjang menyebabkan varieti padi yang ditanam tidak mendapat bekalan pengairan yang mencukupi serta kekurangan hujan mengakibatkan pokok padi mengalami tekanan pertumbuhan. Pokok-pokok padi tersebut mengeluarkan anak yang sedikit, kematangan yang awal dan pengguguran biji benih. Proses ini mengakibatkan pertambahan biji benih di dalam bank tanah dan apabila keadaan menjadi sesuai biji benih ini bercambah dan tumbuh dalam petak sawah, padi ini dikenali sebagai padi batat. Padi batat ini boleh tumbuh sehingga mencapai 40 peratus dalam sesuatu petak sawah (Ho, 1991). Keadaan ini merupakan antara faktor yang menyumbang kepada pertumbuhan padi angin.

Penuaian hasil padi yang menggunakan jentera penuai dari satu petak sawah ke satu petak yang lain tanpa membersihkan jentera terlebih dahulu merupakan salah satu punca penyebaran biji benih. Penyebaran biji benih padi boleh juga berlaku melalui pengaliran air dari sistem pengairan, biji benih yang diterbangkan oleh haiwan, serangga dan tindak balas cuaca seperti angin. Di kawasan sawah MADA dan Tanjung Karang, padi liar (*O. rufipogon*) juga merupakan sumber induk yang boleh menghasilkan debunga untuk proses kacukan silang semula jadi dengan baka indica, samada padi batat atau kultivar yang juga menyumbang pada pertambahan diversiti baka padi angin (Bakar *et al.*, 2000). Benih padi yang dibekalkan dari kawasan MADA dan Tanjung Karang yang tahap ketulenannya rendah telah digunakan petani di negeri lain seperti petani di Pulau Pinang telah mengakibatkan penyebaran padi angin di kawasan tersebut (Bakar *et al.*, 2000).

Pada masa lalu pengecaman padi angin adalah berdasarkan kepada sifat biji padi yang mudah gugur dari tangkainya dan kebiasaan pokok padi angin adalah lebih tinggi berbanding kultivar yang ditanam. Walau bagaimanapun akibat pendomestikasian, penyesuaian alam persekitaran dan proses evolusi genotip telah menyumbangkan kehadiran pelbagai varian padi angin dari segi sifat morfologi dan fisiologi dalam sawah pada masa kini. Sekiranya kehadiran varian padi angin dalam sesuatu petak didapati sebanyak 15 - 30 tangkai/meter persegi, maka ianya boleh menyumbang kemerosotan hasil sekitar 30 - 50 peratus, kehadiran melebihi 21 - 30 tangkai/m<sup>2</sup> maka kemerosotan hasil adalah sekitar 70 - 80 peratus. Walaubagaimanapun kehadiran padi angin melebihi 31 tangkai/m<sup>2</sup> akan menyebabkan kepadatan yang tinggi dan pokok mudah rebah ke atas kultivar akan menjejaskan prestasi hasil dengan banyaknya (Azmi & Watanabe, 1994). Kajian analisis DNA polimorfik teramplifikasi (RAPD) di Tanjung Karang dan MADA menunjukkan terdapat dua kumpulan yang tidak menunjukkan persamaan genetik (Abdullah, 1996). Ini berkemungkinan padi angin beradaptasi pada persekitaran serta pengaliran genetik yang membezakan baka dari kedua-dua kawasan tersebut. Dalam proses pembangunan varieti, pemilihan baka kacukan padi yang memilih baka mudah lerai bijinya juga telah menggalakkan kehadiran padi batat yang akan bertambah dari musim ke musim penanaman padi.

## 2.2 Varian Padi Angin

Padi angin di Malaysia pada umumnya mempunyai ciri morfologi seiras dengan varieti padi yang ditanam kecuali beberapa sifat atau ciri seakan padi tradisional dan padi liar seperti pokok yang tinggi, buku ruas pada batang yang panjang, perikarp berpigmen dan ada sesungut di hujung bijinya. Kebanyakan padi angin mempunyai gen heterogenus pada sifatnya terutama pada ciri morfologinya. Ianya terbahagi kepada dua kumpulan iaitu 1; kehadiran populasi padi angin bersama dengan baka padi liar dalam sesuatu lokasi dan 2; kehadiran padi angin tanpa kehadiran padi liar (Bakar *et al.*, 2000).

Leluhur padi angin di Malaysia belum dapat dikenalpasti secara jelas dan masih diperbincangkan oleh pelbagai pihak. Terdapat satu pendapat mengatakan bahawa kehadiran populasi varian padi angin merupakan hasil evolusi dari kacukan baka kultivar yang ditanam dan baka padi liar di sesuatu kawasan tersebut (Bakar *et al.*, 2002). Walaubagaimanapun Abdullah *et al.* (1996) berpendapat kehadiran varian padi angin adalah evolusi daripada pemilihan kultivar yang mudah gugur biji dari tangkainya dalam proses pembiakbakaan varieti padi di masa lalu. Hipotesis lain pula mengatakan bahawa padi angin berevolusi di Malaysia berkemungkinan melalui dua keadaan iaitu samada proses mutasi terhadap gen yang mengawal pengguguran biji pada tangkai ataupun melalui kacukan kultivar dengan baka yang mudah gugur bijinya. Satu kajian menunjukkan bahawa varian padi angin dari jelapang Tanjung Karang adalah berbeza dari varian yang ditemui di Besut atau di MADA (Bakar *et al.*, 2004). Jelapang padi yang terdapat kehadiran padi angin ditunjukkan dalam gambar foto 2.2.

### **2.3 Jelapang Padi Pulau Pinang**

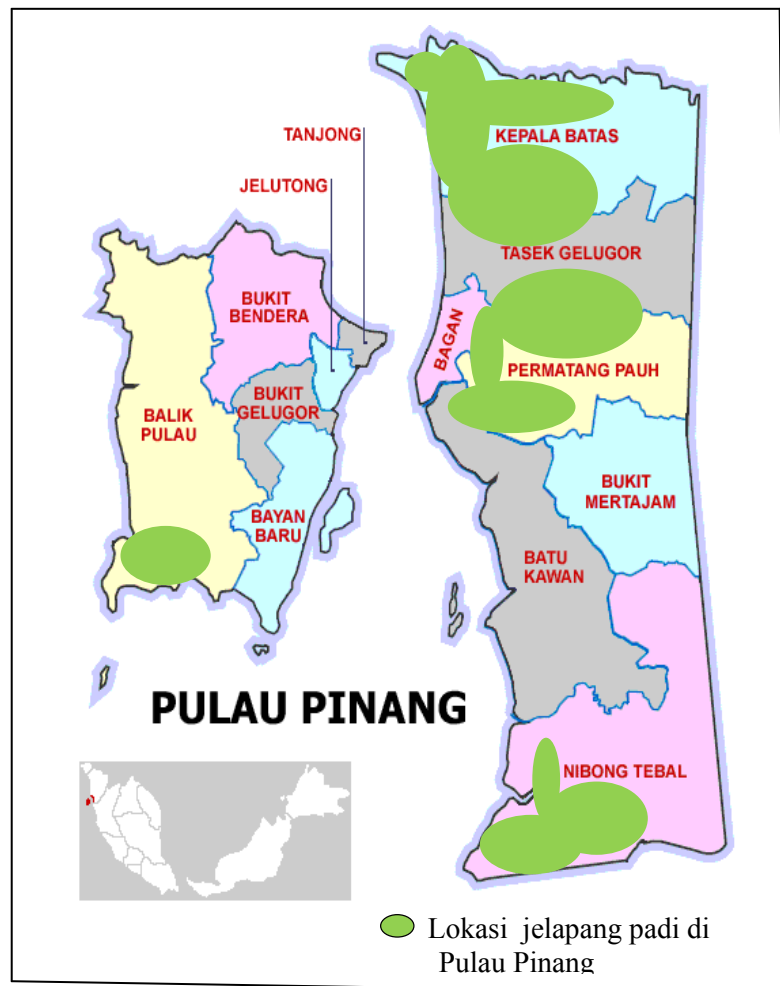
Di Pulau Pinang terdapat sekitar 12,701 ha tanah yang masih diusahakan dengan tanaman padi. Seluas 10,263 ha kawasan merupakan kawasan jelapang padi yang mendapatkan sistem pengairan utama berjadual dan baki kawasan merupakan di luar skim pengairan yang mengusahakan tanaman padi bergantung pada hujan atau pengairan sawah melalui kemudahan sumber air dari persekitarannya (Jabatan Pertanian, 2007). Jelapang padi Pulau Pinang dikenalpasti terbahagi kepada empat lokasi yang dikenali sebagai kawasan utara, kawasan tengah, barat daya dan kawasan selatan.

Kawasan utara Pulau Pinang meliputi 9,214 ha yang meliputi sawah padi dari Permatang Bendahari, Penaga, Permatang Tinggi, Permatang Tiga, Permatang Berangan dan sekitar Kepala Batas. Kawasan tengah mempunyai keluasan sekitar 1,467 ha yang terdiri dari sawah di Permatang Pauh, Bukit Mertajam, Permatang Pasir dan Sungai Dua serta sekitarnya. Lokasi barat daya terletak dalam kawasan Pulau yang berkeluasan 389 ha iaitu sawah di Sungai Nipah, Sungai Burung sekitar kawasan sawah di Balik Pulau. Manakala, kawasan selatan mempunyai keluasan 1,631 ha merupakan kawasan sawah di Nibong Tebal, Sungai Aceh, sempadan Kerian dan sekitar Jawi. Lokasi keseluruhan kawasan padi Pulau Pinang dapat dilihat dengan jelas dalam peta Pulau Pinang dalam (Gambarajah 2.3).





Gambar foto 2.1: Kehadiran varian padi angin dalam petak sawah seperti bertanda bulatan kuning



Gambarajah 2.2 : Peta lokasi kawasan sawah padi Pulau Pinang

Dari tinjauan menunjukkan petani mengamalkan penanaman kaedah tabur terus dalam sistem penanaman dua kali setahun di semua kawasan. Varieti padi popular yang digunakan oleh petani di sini merupakan baka MR 84, MR 185 , MR 211 dan MR 219 (Jab. Pertanian, 1996 hingga 2007). Penggunaan varieti padi di semua kawasan sedekad lalu di tunjukkan dalam Jadual 2.1 di bawah.

Jadual 2.1: Taburan penggunaan varieti di jelapang padi Pulau Pinang (Jab. Pertanian, 1998; 2000; 2002; 2004; 2006; 2007)

Taburan Penggunaan Varieti di jelapang Pulau Pinang (%)											
Tahun	1997	1998	1999	2000	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007
Varieti											
MR 84	91.4	92.5	89.6	91.9	55.2	17.9	6.0	5.3	1.8	3.5	1.8
MR 185	3.2	4.3	5.2	4.5	5.2	1.8	8.2	5.2	4.5	1.2	1.2
MR 211	0	0	0.9	1.2	1.2	0.2	0.2	0	0	0	0
MR 219	0	0	0	0.9	32.3	79.2	90.0	88.9	92.3	84.9	88.7

Padi angin mula dijumpai dalam jelapang Pulau Pinang pada tahun 1996 dan sebaran varian tersebut sekitar 40 ha pada tahun 2004 (Azmi *et al.*, 2005). Walaubagaimanapun, tiada kajian spesifik yang pernah dijalankan di jelapang padi Pulau Pinang tentang kehadiran dan sebaran padi angin tersebut.

## 2.4 Varieti komersial

Program penyelidikan dan pembangunan berterusan telah menghasilkan varieti-varieti dari kacukan kedua kumpulan padi Japonica dan Indica yang menghasilkan pokok yang tegap, daya kerintangan terhadap penyakit tertentu, pokok yang seragam, pengeluaran hasil yang cepat, tahan rebah dan memberikan potensi hasil padi yang tinggi.

Pada tahun 1986, satu varieti padi iaitu MR 84 (gambar foto 2.4) telah diistiharkan, hasil dari proses kacukan yang dibuat pada musim utama 1979/80. Varieti ini mempunyai ciri pengeluaran hasil stabil dan sesuai di semua jelang padi dengan purata hasil 5,500 kg/ha. Baka ini matang dalam tempoh 130 hingga 137 hari selepas tabur terus yang mempunyai ketinggian pokok antara 74 cm hingga 83 cm, serta menunjukkan kerintangan terhadap penyakit karah daun. Namun varieti ini sangat rentan pada penyakit hawar daun bakteria walaupun mempunyai keupayaan pengisian biji yang baik (Chen *et al.*, 1986).

Seterusnya varieti MR 185 (gambar foto 2.5) telah diistiharkan pada tahun 1997 yang dihasilkan daripada kacukan antara baka Y 1056 dan MR 133 pada tahun 1990. Baka ini rintang terhadap penyakit karah dan sederhana rintang terhadap penyakit hawar daun bakteria. Varieti ini mempunyai daun pengasuh yang pendek dan tirus, matang dalam tempoh 112 hingga 119 hari selepas ditabur terus dalam sawah. Varieti ini mempunyai ketinggian diantara 72 cm hingga 84 cm serta berkeupayaan memberikan hasil purata 6,000 kg/ha (Omar *et al.*, 1996)



Gambar foto 2.2: Varieti komersial MR 84



Gambar foto 2.3: Varieti komersial MR 185

Pada tahun 1999, satu varieti padi iaitu MR 211 (Gambar foto 2.6) telah diistiharkan yang berasaskan pada ciri penghasilan pengeluaran padi yang tinggi, kerintangan pada penyakit karah sederhana rintang pada penyakit merah dan hawar bakteria. Varieti ini matang dalam tempoh 110 hingga 120 hari memberikan hasil purata 6,000 kg/ha, yang mempunyai bilangan biji padi bernas di antara 70 - 85 setangkai. Keistimewaan padi ini mempunyai kandungan amilosa lebih rendah, menghasilkan tekstur nasi lembut dan kualiti tinggi (Omar *et al.*, 1999).

Pada tahun 2001 pula telah diistihar secara rasmi varieti padi MR 219 (Gambar foto 2.7), memberikan hasil yang lebih tinggi iaitu purata 6,500 kg/ha dengan pengurusan ladang yang baik, boleh meningkatkan hasil sehingga 10,000 kg/ha. Varieti ini juga mempunyai kerintangan pada penyakit karah dan sederhana rintang pada penyakit merah dan hawar bakteria. Varieti MR 219 ini mempunyai bilangan biji padi bernas purata 88 biji setangkai, kandungan amilosa yang rendah, memberikan kualiti nasi yang lembut (Alias *et al.*, 2001).

## **2.5 DNA Mikrosatelit**

Mikrosatelit merupakan jujukan DNA pendek berulang (short tandem repeat, str) yang mengandungi antara 10 hingga ratusan pasangan bes. Urutan-urutan DNA pendek ini boleh terdiri daripada unit berulang di, tri atau tetranukleotida, yang berturutan setiap satunya (Park & Moran, 1994). Namun kebanyakan unit ulangan adalah unit ulangan dinukleotida, contohnya (AT/CG) yang paling banyak dilihat di dalam sel eukariot (Othman, 2004).





Gambar foto 2.4: Varieti komersial MR 211



Gambar foto 2.5: Varieti komersial MR 219

Contohnya:

( CA )<sub>n</sub> : dinukleotida

( CAT )<sub>n</sub> : trinukleotida

( CATG )<sub>n</sub> : tetranukleotida,

dengan n merupakan bilangan ulangan bagi nukleotida tertentu. Mikrosatelit juga boleh dikelaskan kepada tiga kumpulan mengikut kehadiran jujukan ulangan yang bersifat kodominon serta bersifat polimorfik. Tiga kumpulan yang dimaksudkan adalah:

i) Ulangan tulen/sempurna

Contohnya CACACACACACACACACA.....

ii) Ulangan majmuk

Contohnya CACACACAGTGTGTGTGT...

iii) Ulangan terputus

Contohnya CACACATTACACATTCA..

Kehadiran turutan DNA yang bervariasi berpotensi memberikan banyak maklumat dan penjelasan sesuatu ciri. Ianya amat berguna dalam kajian kepelbagaian genetik termasuklah dalam projek pencapjarian genetik. Mikrosatelit juga merupakan penanda DNA lokus tunggal serta mempunyai kadar mutasi yang tinggi, ia selalunya menunjukkan kehadiran alel yang tinggi (Saghai - Maroof *et al.*,1994).

## **2.6 Tindak balas Rantaian Polimerase, PCR**

### **2.6.1 Pengenalan**

Seorang ahli sains Amerika, Kary Mullis yang memperkenalkan tindak balas rantaian polimerase (PCR) sebagai satu teknik biokimia. Tindakbalas rantaian Polimerase adalah teknik *in vitro* melibatkan amplifikasi DNA spesifik yang terletak

dalam dua kawasan sempadan yang jujukannya telah dikenalpasti. Pada masa ini, teknik ini digunakan dengan meluas untuk mengamplifikasi atau mengklon sesuatu fragmen DNA tertentu secara *in vitro* tanpa memerlukan sel bakteria semasa proses pengklonan (Othman, 2004)

Teknik ini membolehkan amplifikasi jutaan jujukan DNA terpilih daripada sesuatu genom. Kaedah PCR telah menjadi teknik berguna dalam perkembangan bidang penyelidikan DNA rekombinan. Ianya telah merevolusikan penyelidikan DNA rekombinan dan mempunyai kesan yang besar dalam bidang biologi molekul dan genetik.

### **2.6.2 Teknik PCR (Polymerase Chain Reaction)**

Dalam proses tindakbalas PCR, urutan DNA sasaran boleh digandakan berjuta kali dalam tempoh beberapa jam sahaja. Keperluan utama tatacara ialah sekurang-kurangnya jujukan nukleotida satu segmen pendek DNA di kedua-dua belah kawasan yang ingin dikaji diketahui. Maklumat tersebut digunakan untuk membentuk primer atau pencetus pada kedua-dua belah turutan DNA. Pencetus oligonukleotida sintetik ini seterusnya digunakan untuk memulakan amplifikasi berenzim segmen DNA yang terletak di tengah-tengah dua pencetus oligonukleotida dalam tabung uji tanpa penggunaan sel hidup (Othman, 2004). Pencetus oligonukleotida bertindak sebagai pencetus dan dipanjangkan pada templat DNA bebenang tunggal oleh DNA polimerase dengan kehadiran bersama deoksinukleotida trifosfat (dNTP), iaitu dATP, dCTP, dGTP dan dTTP (Ellstrand *et al.*, 1999). Protokol PCR pada asasnya merangkumi tiga peringkat iaitu

#### **I) Penyahaslian**



II) Penyepuhan

III) Pemanjangan pencetus

Gambarajah 2.2 menunjukkan proses amplifikasi yang berlaku dalam setiap kitar PCR. Penyahasilan merupakan proses templat DNA bebenang gandadua dipisahkan menjadi DNA tetali tunggal pada suhu tinggi ( $94^{\circ}\text{C}$ ).

Penyepuhan pula proses suhu campuran diturunkan kepada antara  $35^{\circ}\text{C}$  hingga  $60^{\circ}\text{C}$  untuk membenarkan pencetus bergabung dengan turutan yang menyempadani segmen DNA sasaran yang ingin diamplifikasi. Suhu penyepuhan mempunyai variasi mengikut turutan tertentu, panjang dan kandungan bes G dan C pada primer yang digunakan.

Kebiasaannya dua jenis pencetus digunakan setiap satu mempunyai turutan yang berkomplemen kepada salah satu daripada kedua-dua bebenang DNA.

Pencetus menyusun dengan hujung  $3'$  mengadap sesama sendiri oleh kerana masing-masing bergabung dengan tetali yang bertentangan. Di samping itu kepekatan pencetus dicadangkan antara  $0.1\text{-}0.5\ \mu\text{M}$  untuk pembentukkan produk yang spesifik dan kepekatan pencetus berlebihan akan menggalakkan pembentukkan dimer pencetus dan salah padan. Pemanjangan pencetus dengan *Taq* DNA polimerase memanjangkan pencetus melalui aktiviti polimerase dari hujung  $5'$   $\alpha$ -fosfat ke hujung  $3'$  deoksinukleotida trifosfat dengan menggunakan DNA bebenang tunggal sebagai templat. Pada proses sintesis suhu akan ditingkatkan pada  $72^{\circ}\text{C}$  yang merupakan suhu optimum bagi tindakbalas oleh enzim *Taq* DNA polimerase. Proses pemanjangan pencetus bermula pada hujung  $3'$  membolehkan penyalinan DNA sasaran sehingga membentuk satu utasan pelengkap yang baru membentuk satu molekul DNA utasan ganda dua.

Utusan DNA ganda dua/dubel

5'CCCGGATGGGACTGGA.....ATGGCTCTCACCTAT-3'  
3'GGGCCTACCCTGACCT.....TACCGAGAGTGGATA-5'

Nyahaslian pada suhu 95 °C menghasilkan  
dua utusan DNA tunggal

5'CCCGGATGGGACTGGA.....ATGGCTCTCACCTAT-3'  
3'GGGCCTACCCTGACCT.....TACCGAGAGTGGATA-5'

Perlekatan/penyepuhan pencetus dengan  
DNA templat pada jujukan yang  
berkomplemen pada suhu 40 – 60 °C

5'CCCGGATGGGACTGGA.....ATGGCTCTCACCTAT-3'  
← TACCGAGAGTGGATA•  
• CCCGGATGGGACTGGA→  
3'GGGCCTACCCTGACCT.....TACCGAGAGTGGATA-5'

Sintesis utusan DNA baru oleh enzim  
DNA polimerase pada suhu 72 °C  
menghasilkan dua utusan DNA ganda  
dua

5'CCCGGATGGGACTGGA.....ATGGCTCTCACCTAT-3'  
3'GGGCCTACCCTGACCT.....TACCGAGAGTGGATA-5'

5'CCCGGATGGGACTGGA.....ATGGCTCTCACCTAT-3'  
3'GGGCCTACCCTGACCT.....TACCGAGAGTGGATA-5'

Ulangan ketiga-tiga langkah sebanyak  
30 - 40 kitaran. Selepas 20 kitar, sejumlah  
 $2^{20}=1,048,576$  salinan DNA ganda dua  
dihasilkan

Langkah-langkah asas dalam PCR

Gambarajah 2.3: Langkah langkah proses amplifikasi yang berlaku dalam setiap kitar PCR (Othman, 2004)

Seterusnya kitaran baru dimulakan dengan suhu ditingkatkan semula ke 94 °C membolehkan utasan tetali baru dan lama pada DNA yang disintesis sebelum ini terpisah dan suhu diturun untuk membolehkan pencetus bergabung semula dengan DNA sasaran yang mana dalam kitaran ini sudah terdapat dua kali ganda dari asal dan suhu pertingkatkan ke 72° C untuk pemanjangan pencetus. Proses ini diulangkan sebanyak 30 kali dan dianggarkan bahawa lebih dari satu juta salinan dihasilkan.

Walaupun ketiga-tiga proses boleh ditentukan bilangan kitaran dengan memprogramkan mengikut keperluan kajian tetapi aspek kebersihan perlu dijaga seperti peralatan yang steril, bahan yang tidak terkontaminasi dan kawasan perlakuan kerja mestilah bersih dan steril. Di samping itu beberapa parameter yang boleh mempengaruhi kuantiti dan kualiti amplikasi seperti kepekatan bahan uji perlu diberi perhatian (Andrea & Aaron, 1998).

Pencetus mikrosatelit merupakan pencetus yang menyempadani kawasan jujukan ulangan pendek kebiasaannya dari 10 – 20 pasangan bes yang boleh menyepuh pada tempat yang sepadan dengan turutan besnya dalam templat DNA padi yang dibekalkan. Penanda molekul ini mempunyai sifat ko-dominan iaitu kehadiran alel-alel dapat dikesan dan dibezakan dalam individu heterozigot dan pewarisan dari induk kepada anak menepati ciri-ciri perwarisan Mendel (Othman, 2004).

Mikrosatelit merupakan penanda molekul yang sesuai dalam kajian molekul dan genetik. Ianya menjadi penanda pilihan untuk pelbagai kajian salasilah dan kajian populasi sesuatu spesies. Dalam proses tindakbalas PCR, pencetus mikrosatelit yang bervariasi bertahap tinggi boleh beramplifikasi orientasi turutan atau orientasi songsangan pada sasaran dua hujung sempadan jujukan dikehendaki. Ianya sangat sesuai bagi kajian pemetaan genetik, analisis keturunan untuk sesuatu individu dalam

spesies (Nagaoka & Ogihara, 1997). Kajian lokus pewarisan menggunakan pencetus mikrosatelit menunjukkan keputusan yang hampir bersamaan dengan nisbah klasik Mendelian. (Tanaka *et al.*, 1999).

## **2.7 Elektroforesis Gel**

Penggunaan gel agarosa adalah bahan yang sesuai untuk proses elektroforesis bagi bahan DNA atau bahan protein. Saiz liang atau jarak antara molekul gel yang terbentuk adalah mengikut kepekatan yang digunakan. Pembentukan liang antara molekul gel yang bersaiz besar berdekatan telaga dan semakin jauh dari telaga menghasilkan saiz yang kecil dan lebih padat. Apabila bahan DNA bersama penimbal muatan dimasukkan ke dalam telaga dan dikenakan medan elektrik, maka bahan DNA yang bercas negatif akan bergerak ke hujung kutub bercas positif melalui liang-liang molekul agarosa. Bahan DNA yang bersaiz besar atau berat akan tersekat berdekatan telaga dan bahan protein atau DNA saiz kecil bergerak ke arah bawah. Penggunaan gel poliakrilamida lebih efektif untuk memisahkan bahan DNA yang bersaiz kecil (5 - 1,000 bp). Ianya juga mempunyai kuasa pemisahan yang tinggi dan mampu memisah jalur-jalur bahan DNA yang mempunyai perbezaan saiz yang besar serta kualiti yang dipencilkan lebih baik ( Muhammad & Mohd Nor, 2004).

## **2.8 Aplikasi Mikrosatelit Sebagai Penanda DNA**

Penanda molekular yang pertama adalah penanda protein yang secara genetik dikenali sebagai penanda isozim (Hunter dan Markert 1957). Penanda ini telah banyak digunakan dalam analisis genetik tanaman, namun aplikasi penanda isozim terbatas perkembangannya. Selain itu, beberapa proses enzim mempengaruhi tindakbalas dalam

jujukan DNA, contohnya dalam mengekspresikan suatu sifat pada jujukan DNA tertentu. Kedua-dua faktor tersebut merupakan aspek penting penggunaan penanda isozim dalam mengeksploitasi potensi genetik tanaman (Hamrick dan Gode 1989).

Pada awal tahun 1980an penemuan teknologi molekuler yang berasaskan DNA yang telah mengatasi kekurangan pada penanda isozim. Penanda DNA tersebut dapat dihasilkan dengan jumlah yang banyak dan dapat mengamplifikasi pada seluruh genom tanaman. Penanda ini tidak di pengaruhi oleh tindakbalas dalam jujukan DNA, dan dapat dikesan pada seluruh jujukan. Ianya berkeupayaan beramplifikasi pada tahap variasi yang tinggi dalam mempamerkan keragaman karakter antara individu (Smith dan Smith 1992). Perkembangan teknologi yang berasaskan penanda DNA telah menemukan mikrosatelit sebagai penanda DNA dalam proses tindak balas rantai polimerase (*Polymerase Chain Reaction*, PCR). Pencetus mikrosatelit merupakan pencetus yang menyempadani kawasan jujukan ulangan pendek kebiasaannya dari 10–20 pasangan bes yang boleh menyepuh pada tempat yang sepadan dengan turutan besnya dalam templat DNA padi yang dibekalkan.

Penanda molekul ini mempunyai sifat ko-dominan iaitu kehadiran alel–alel dapat dikesan dan dibezakan dalam individu heterozigot dan pewarisan dari induk kepada anak menepati ciri-ciri perwarisan Mendel (Othman, 2004). Mikrosatelit merupakan penanda molekul yang sesuai dalam kajian molekul dan genetik. Ianya menjadi penanda pilihan untuk pelbagai kajian salasilah dan kajian populasi sesuatu spesis. Dalam proses tindakbalas PCR, pencetus mikrosatelit yang bervariasi bertahap tinggi boleh beramplifikasi orientasi turutan atau orientasi songsangan pada sasaran dua hujung sempadan jujukan dikehendaki. Ianya sangat sesuai bagi kajian pemetaan genetik, analisis keturunan untuk sesuatu individu dalam spesis (Nagaoka & Ogihara, 1997).

Kajian lokus pewarisan menggunakan pencetus mikrosatelit menunjukkan keputusan yang hampir bersamaan dengan nisbah klasik Mendelian. (Tanaka *et al.*, 1999).

Kajian yang lepas telah dilaksanakan menggunakan penanda DNA mikrosatelit untuk pemerhatian tentang variabiliti dan frekuensi alel dalam inter spesies dan intra spesies tumbuhan Oak. Begitu juga penanda mikrosatelit telah digunakan untuk menganggar jarak genetik dan kevariabelan genetik antara populasi yang rapat telah dibuktikan dalam banyak kajian dengan spesies ruminan (Edfors-lijia *et al.*, 1995). Proses saringan dalam pembaikbakaan tanaman jagung menggunakan penanda DNA yang bertujuan untuk memperbaiki mutu protein pada jagung *Quality Protein Maize* (QPM) telah dilakukan secara intensif menemukan mutan jagung berbiji opak yang mengandungi lisin tinggi yang diatur oleh gen *opaque-2*. Gen *opaque-2* yang meningkatkan kadar lisin dan triptofan pada endosperma jagung telah dimanfaatkan untuk menghasilkan QPM (Mertz *et al.* 1964).

Dalam kajian tanaman padi pula, 16 penanda mikrosatelit telah digunakan untuk kajian perbandingan hubungan genetik antara padi merah USA (Amerika Syarikat) dengan varieti padi dan varian padi angin dari Asia (Londo *et al.*, 2006). Satu lagi kajian sebanyak 30-35 penanda DNA mikrosatelit telah digunakan untuk kajian perbandingan antara padi merah dan varieti Komersial USA (Amerika Syarikat) (Vaughan *et al.*, 2001 ; Gearly *et al.*, 2006). Kajian diversiti genetik terhadap padi angin dengan baka Japonica dan padi merah di kawasan Mediterranean dan Brazil telah dijalankan menggunakan penanda DNA mikrosatelit (Federici, 2001; Ferrero, 2001). Satu lagi kajian padi telah dijalankan menggunakan penanda DNA dalam saringan dan pemilihan baka padi untuk mengenal pasti jumlah gen dan kekerapan kehadiran gen ketahanan kemarau pada baka yang dikaji (Nguyen dan Bui, 2008).

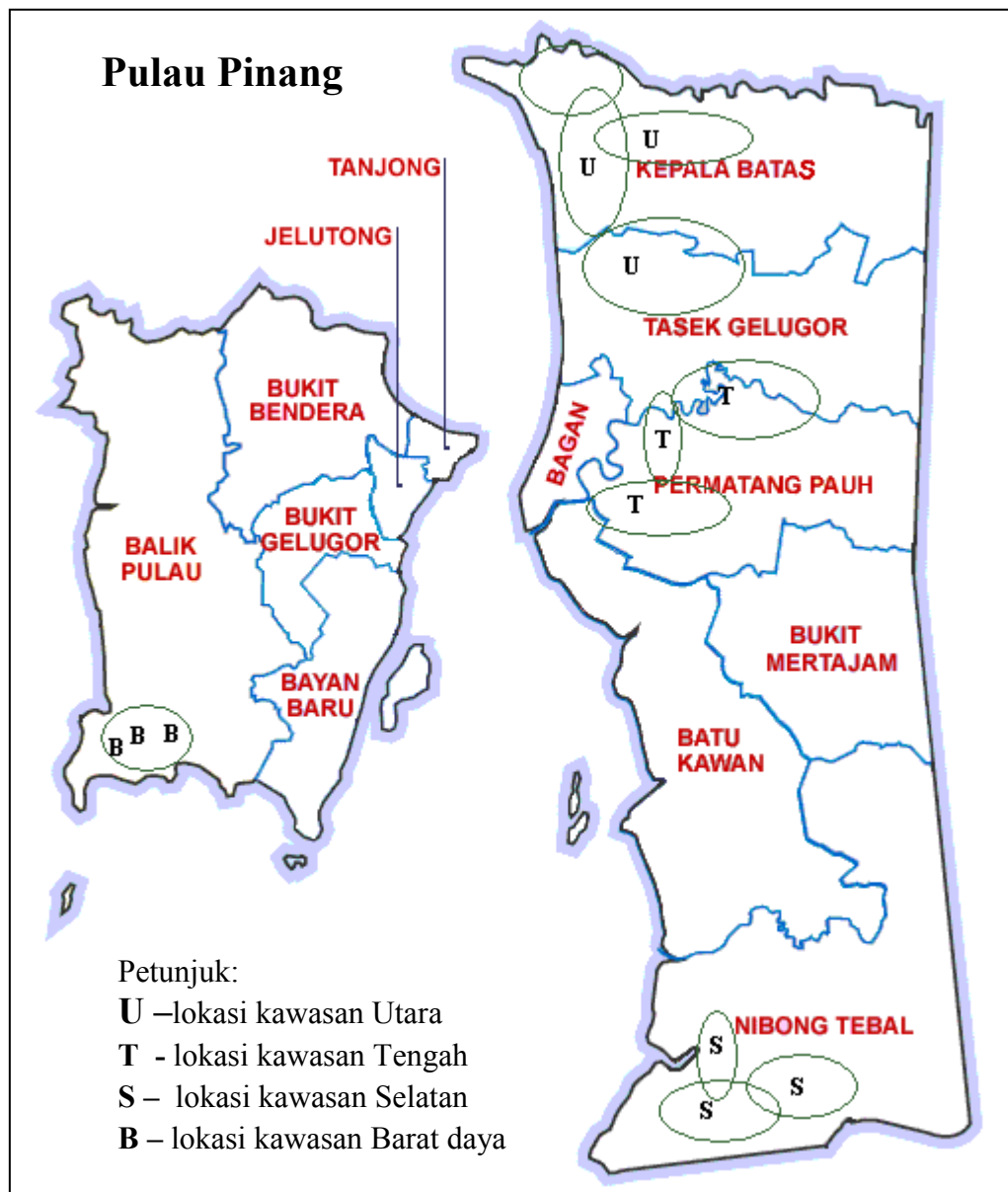
### 3.0 BAHAN DAN KAEDAH

#### 3.1 Pengumpulan Sampel dan Lokasi Kajian

Pengambilan sampel semua varian padi yang terdapat di jelapang padi Pulau Pinang telah dijalankan sebanyak dua kali pada musim luar 2007 dan musim utama 2008. Pengutipan sampel dilakukan secara rawak di empat lokasi kajian pada masa 75 - 90 hari selepas tanam iaitu semasa lebih 80 peratus biji padi telah berisi serta pada proses peringkat kematangan. Persampelan dijalankan melalui pemerhatian dan mengutip semua varian padi yang tumbuh berbeza sifat morfologi daripada padi komersial yang ditanam. Lokasi pengambilan sampel di semua petak kajian telah direkod data pemetaan satelit menggunakan alat *global position system (GPS)* ditunjukkan dalam Jadual 3.1 dan gambarajah 3.1 di bawah:

Jadual 3.1: Lokasi kawasan kajian di Pulau Pinang

Lokasi	Kedudukan dari Utara	Kedudukan dari Timur
Kawasan Utara	5 ° 34.402min –	100 ° 23.198 min –
	5 ° 34.514min	100 ° 23.337 min
Kawasan Tengah	5 ° 24.802min –	100 ° 25.664 min –
	5 ° 24.919min	100 ° 25.854 min
Kawasan Barat Daya	5 ° 20.263min –	100 ° 12.151 min –
	5 ° 20.383min	100 ° 12.221 min
Kawasan Selatan	5 ° 8.802min –	100 ° 26.544 min –
	5 ° 8.816min	100 ° 27.792 min



Gambarajah 3.1: Peta lokasi persampelan varian padi di sawah Pulau Pinang